

Title	Multilineage Differentiation of Cbfa1-Deficient Calvarial Cells In Vitro
Author(s)	小林, 裕彦
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43233">https://hdl.handle.net/11094/43233</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	こ ばやし ひろ ひこ 小 林 裕 彦
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 4 7 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 13 年 7 月 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Multilineage Differentiation of <i>Cbfa1</i> -Deficient Calvarial Cells <i>In Vitro</i> ( <i>Cbfa1</i> 欠損マウス頭蓋冠由来細胞の <i>in Vitro</i> における多分化能)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松澤 佑次  (副査) 教 授 吉崎 和幸    教 授 吉川 秀樹

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

*Drosophila* の体節形成遺伝子である *runt* と相同性を有する *Cbfa1* は、そのノックアウトマウスの解析より、骨形成、特に骨芽細胞分化に必須な遺伝子であることが明らかとなった。ヘテロ変異体マウスでは鎖骨の低形成、頭蓋縫合、泉門の開大等、鎖骨頭蓋異形成症に一致した表現型を示し、また鎖骨頭蓋異形成症患者に *Cbfa1* の変異が見出され、その原因遺伝子として特定された。これらの報告を踏まえ、実際に *Cbfa1* ホモ変異体マウスから頭蓋冠由来の間葉系細胞を調整し、その初代培養における性状解析、並びに低濃度 (50ng/ml) の rhBMP2 刺激の細胞分化に及ぼす影響、さらにこれら細胞の *in vivo* における分化能を検討した。

#### 【方法】

胎生18.5日の *Cbfa1* ホモ変異体マウスと正常マウスの頭蓋冠を採取し、コラーゲンゲル内で培養した後、遊離増殖した細胞を回収し以下の実験を行った。

- (1)各細胞を培養、コンフルエントに達した後、培地を細胞分化用培地 (rhBMP2 (山之内製薬より供与) 50ng/ml を添加あるいは無添加) に交換し、RNA を調整した。それぞれの RNA について半定量的 RT-PCR を行い骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞の分化マーカー遺伝子の発現を解析した。
- (2)アルシアンブルー染色、オイルレッドO染色を用いて、軟骨細胞および脂肪細胞への分化を形態的に観察した。
- (3) Kossa 染色を用いて各細胞の石灰沈着を形態的に観察すると共に、カルシウムを塩酸で溶出してその濃度変化を追跡した。
- (4)各細胞を rhBMP2 と共に Diffusion Chamber に入れヌードマウスの腹腔内に移植し、これら細胞の骨芽細胞並びに軟骨細胞への分化能をアルカリホスファターゼ染色トリジンブルー染色を用いて形態的に観察した。

#### 【成績】

骨芽細胞特異的分化マーカーであるオステオカルシンは、*Cbfa1* ホモ変異体細胞では検出されず、低濃度 (50ng/ml) の rhBMP2 刺激でも発現の上昇は見られなかった。また、骨結節の出現も認められなかったことから、*Cbfa1* ホモ変異体細胞の骨芽細胞系列への分化能は認められず、rhBMP2 による刺激によってもその分化能を回復することはできなかった。しかしこれらの細胞は rhBMP2 による刺激を加えない条件下で、自然発生的にオイルレッドO染色で染色される脂肪細胞へと分化し脂肪細胞の分化マーカーである PPAR $\gamma$ 2、LPL、aP2 を著しく発現した。

また、低濃度 rhBMP2 による刺激を加えた条件下では、脂肪細胞の出現は極度に減少し、アルシアンブルーで染色される軟骨様結節が多数出現、さらに軟骨細胞分化の特異的マーカーであるⅡ型コラーゲン並びにⅩ型コラーゲンの顕著な発現を認めた。ここで観察された軟骨様結節は、長期培養においてすべて Kossa 染色で染色される石灰化軟骨にまで成熟し、カルシウム濃度も著しく上昇することから Cbfa1 ホモ変異体細胞がこの条件下で、軟骨細胞の最終分化段階にまでその分化がすすんでいることが確認された。また、Cbfa1 ホモ変異体細胞を rhBMP2 と共にヌードマウスの腹腔内に移植し、これら細胞の *in vivo* における分化能を検討した結果、トリジンブルーで染色される軟骨細胞への分化を認めた。これに対して正常マウスの頭蓋冠由来の細胞は *in vitro* においても *in vivo* においても一様に、オステオカルシンを発現し骨結節を形成する骨芽細胞系列への分化傾向を示した。

#### 【総括】

Cbfa1 ホモ変異体マウスの頭蓋冠由来細胞は、正常細胞とは異なり骨芽細胞への分化能を完全に欠損しており、脂肪細胞や軟骨細胞などの他の細胞系列への分化傾向を示した。したがって、本研究から、頭蓋冠周辺に存在して将来的に頭蓋冠を形成するであろう細胞は、もともと多分化能を有する多能性未分化間葉系細胞であり、Cbfa1 がそれら細胞の骨芽細胞系列への移行に決定的な役割を果たしていることが示された。同時に、脂肪細胞への分化に対しては阻害的に働いていることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本論文では、骨形成のマスター遺伝子である *Cbfa1* の機能を *in Vitro* において詳細に解析した内容であった。特に、本来骨芽細胞に分化することが知られている頭蓋冠由来間葉系細胞 (calvarial cells) が *Cbfa1* を欠損することによって、自然発生的に脂肪細胞に分化し、骨形成因子 BMP2 の添加によってもその骨芽細胞への分化能を回復することができず軟骨細胞に分化するという発見は、将来的に頭蓋冠を形成する細胞はもともと多分化能を有する未分化間葉系細胞から発生していることを示しており、今後の骨代謝研究の発展に大きく貢献するものであった。したがって、本論文は学位の授与に値すると考えられる。